

DIALOG(R)File 347:JAPIO
(c) 2001 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

02529929

STABLE GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR-CONTAINING PREPARATION

PUB. NO.: 63 -146829 [JP 63146829 A]
PUBLISHED: June 18, 1988 (19880618)
INVENTOR(s): MACHIDA MINORU
APPLICANT(s): CHUGAI PHARMACEUT CO LTD [000331] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)
APPL. NO.: 62-178035 [JP 87178035]
FILED: July 16, 1987 (19870716)
INTL CLASS: [4] A61K-037/02; A61K-047/00; A61K-047/00; A61K-047/00;
A61K-047/00
JAPIO CLASS: 14.4 (ORGANIC CHEMISTRY -- Medicine)
JAPIO KEYWORD:R059 (MACHINERY -- Freeze Drying)
JOURNAL: Section: C, Section No. 540, Vol. 12, No. 410, Pg. 4, October 28, 1988 (19881028)

ABSTRACT

PURPOSE: To obtain the titled preparation containing granulocyte colony stimulating factor as an active ingredient and at least one of an amino acid, a sulfur- containing reducing agent and an antioxidant.

CONSTITUTION: A stable granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)-containing preparation comprising 1pt.wt. G-CSF (e.g. human G-CSF as an active ingredient and 1-10,000pts.wt. at least one selected from a group consisting of an amino acid (e.g. glycine, threonine, tryptophan, lysine, methionine, etc.), a sulfur-containing reducing agent (e.g. N-acetylcysteine, N- acetylhomocysteine, thiocetic acid, glutathione, etc.) and an antioxidant (e.g. erysorbic acid, bibutylhydroxytoluene, EDTA, polyphosphate, etc.). The preparation can be used by various administration forms such as oral administration and parenteral administration such as many injections, etc. Adsorption on the wall of container can be prevent and consumption of expensive component can be hindered.

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-146829

⑬ Int. Cl.⁴A 61 K 37/02
47/00

識別記号

ABD
3 0 2
3 1 6
3 2 2
3 2 4

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)6月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤

⑯ 特 願 昭62-178035

⑰ 出 願 昭62(1987)7月16日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)7月18日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭61-169490

㉑ 発 明 者 町 田 実 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内

㉒ 出 願 人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号

㉓ 代 理 人 弁理士 越 場 隆

明 細 書

1. 発明の名称

安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤

2. 特許請求の範囲

(1) 有効成分として顆粒球コロニー刺激因子を含有し、製薬上許容されるアミノ酸、含硫還元剤および酸化防止剤から成る群から選ばれる少なくとも1種を含むことを特徴とする安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

(2) 上記アミノ酸、含硫還元剤および酸化防止剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を、顆粒球コロニー刺激因子1重量部に対し1重量部～10,000重量部の範囲内の量で含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

(3) 上記アミノ酸が、グリシン、トレオニン、ト

リプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンから成る群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項に記載の安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

(4) 上記含硫還元剤が、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸およびその塩、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、チオ乳酸、ジチオスレイトール、グルタチオン並びに炭素原子数1～7のスルフヒドリル基を有する温和な含硫還元剤から成る群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項に記載の安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

(5) 上記酸化防止剤が、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、*d,l*- α -トコフェロール、 γ -アスコルビン酸及びその塩、 γ -アスコルビン酸パルミテート、 γ -アスコルビン酸ステアレート、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルおよびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ポリリン酸塩から成る群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項に記載の安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子含有製剤に関し、特に保存中の活性成分の損失、不活性化あるいは分解等を有利に防止し、有効成分を安定化した顆粒球コロニー刺激因子含有製剤に関するものである。

回避し得ない問題があり、そのために被感染体即ち宿主の防禦機能を賦活化し得るような物質を薬剤として用いる試みがなされている。

G-CSFは勿論、それ自身に宿主の防禦機能を賦活化する活性を有し、臨床上的治療効果をさらに十分に発揮すべく、上述した薬剤との併用の場合に於ても、その目的を遂行する上で、極めて有用であることが判明した。

このG-CSFは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、 $0.1 \sim 500 \mu g$ (好ましくは $5 \sim 50 \mu g$)のG-CSFを含有する製剤を1~7回/週の割合で投与する。しかしながら、G-CSFは不安定で、例えば温度、湿度、酸素、紫外線等の外的因子の影響を受けやすく、その結果として会合、重合あるいは酸化分解などの物理的、化学的变化を生じ、大きな活性の低下を招く。このことは極めて微量の投与量のG-CSFを、しかも極めて正確に投与しようとする治療行為を完全に遂行できなくするばかりか、有効成分の損失分を予め見積もって余分に医薬中に添加しておか

従来の技術

最近、各種感染症の化学療法においては、耐性菌発生、原因菌の交代現象、あるいは高い副作用などが臨床的に重大な問題となっており、そのため、抗生物質、抗菌剤等による上記の如き化学的療法とは別に感染菌宿主の防禦機能を活性化するような物質を用いることにより、上記化学療法の根本的な問題の解決を図ろうとする動きがある。即ち、例えば細菌感染の初期には宿主のもつ防禦機能のうちで白血球の貪食殺菌作用が最も強く影響すると考えられており、そこで好中球の増殖、分化成熟を促進することにより宿主の感染防禦機能の亢進を図ることが重要と考えられる。このような作用を示す極めて有用な物質の一つとして顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)があり、既にこれを用いた感染防禦剤が本出願人によって別途特許出願されている(特願昭60-23777号)。

発明が解決しようとする問題点

上記の如く、各種化学療法においては、各種の

なければならぬことを意味する。

そこで、このような問題点を解決し、有効成分の活性の低下を十分に防止できる製品を開発する必要がある。本発明の目的はこのような点にある。即ち、安定なG-CSF含有製剤を提供することである。

問題点を解決するための手段

本発明は上記目的とするG-CSF含有製剤の安定性を改善すべく種々検討、研究した結果、製薬上許容されるアミノ酸、含硫還元剤、酸化防止剤もしくはこれらの混合物を添加することが有効であることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明の安定なG-CSF含有製剤は、有効成分としてG-CSFを含有し、製薬上許容されるアミノ酸、含硫還元剤および酸化防止剤から成る群から選ばれる少なくとも1種を含むことを特徴とする。

また、本発明で使用するG-CSFは、例えば既に出願されている特願昭59-153273号、同60-

269455号、同60-269456号、同60-270838号、同60-270839号明細書に記載の各種方法に従って得ることができ、例えばヒトG-CSFは口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株(CNCM受託番号「I-315」、同「I-483」)の培養により、あるいは更にヒトG-CSFをコードする遺伝子を用いて組換えDNAを作製し、これを適当な宿主細胞(例えば大腸菌、C-127細胞、チャイニーズハムスターの卵巣細胞等)で発現させるなどによって得ることができる。

本発明におけるG-CSFとしては高純度に精製されたヒトG-CSFであれば全て使用できるが、ヒトG-CSF産生細胞を培養して得られる培養上清から単離して得られるもの及びヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだ組換えベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体が産生する、ヒトG-CSF活性を有するポリペプチドまたは糖蛋白質が好ましい。

具体的には、次の(i)及び(ii)で示すG-

Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu), Cys Ala Thr
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro
Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu
Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu
Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp
Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr
Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala
Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
Leu Ala Gln Pro (但しmは0又は1を表わし、
nは0又は1を表わす)。

なおこれらのG-CSFの詳細な製造方法については、本出願人が先に出願した特願昭59-153273号、特願昭60-269455号、特願昭60-269456号、特願昭60-270838号、特願昭60-270839号明細書

C SFが特に好ましく用いられる。

(i) 次の理化学的性質を有するヒトG-CSF。

- ①分子量：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定で約 $19,000 \pm 1,000$ 。
- ②等電点： $pI = 5.5 \pm 0.1$ 、 $pI = 5.8 \pm 0.1$ 、 $pI = 6.1 \pm 0.1$ の三つの等電点のうち少なくとも1つを有する。
- ③紫外部吸収：280nmに極大吸収を有し、250nmに極少値をもつ。

④N末端から21残基目迄のアミノ酸配列が次の如くである。

H₂N-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-Gln-Val-

(ii) 下記のアミノ酸配列またはその一部で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド又はこれと糖鎖部を有する糖蛋白質を含有するヒトG-CSF。

(Met), Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln

を参照されたい。

又、その他の方法としてG-CSF産生細胞と自己増殖能を有する悪性腫瘍細胞とを細胞融合して得られるハイブリドーマをマイトジェンの存在下または不在下で培養することによって得ることができる。

これ等の方法で得られたヒトG-CSF含有液は必要により公知の手段でさらに精製、濃縮した後凍結保存するかまたは凍結乾燥などの手段により水分を除去して保存することができる。

このようにして得たヒトG-CSFは全て本発明によって安定なG-CSF含有製剤とすることができる。

本発明の安定なG-CSF含有製剤をえるために使用する安定化剤としてのアミノ酸は、グリシン、トレオニン、トリプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンなどであり、また含硫還元剤としてはN-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグ

リコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸およびその塩、チオ硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、チオ乳酸、ジチオスレイトール、グルタチオン並びに炭素原子数1~7のチオアルカン酸などのスルフヒドリル基を有する温和な含硫還元剤などを例示でき、更に酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、d,l- α -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸およびその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルなどあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウムの如きキレート剤を例示できる。

安定な本発明のG-C-S-F含有製剤は、これらの群から選ばれた少なくとも1種を含むものである。

活性などといった免疫応答力にもずいた防禦機能自体をも同時に改善するために、この目的で有効な成分を添加併用することが、临床上極めて有用な手段であることが判明してきた。

この種の成分の一つであるG-C-S-Fは極めて微量で使用される。従って、このG-C-S-Fを極低濃度の水溶液等として取扱う場合には、例えば注射器等に入れたり、アンプル等の容器に収容して使用することが多い。このような場合、G-C-S-Fは各種外的因子、例えば、温度、湿度、酸素、紫外線等の因子により影響をうけ、会合、重合あるいは酸化等を受ける。このような物理的、化学的変化はG-C-S-Fの大きな活性の低下を招く。

このことにより容器内の薬液中の有効濃度、あるいは所定単位用量中の成分の目的とする活性を維持することが困難であるといった問題がみられた。従って、治療上必要とされる以上の量を、不安定のために損失する量を考慮し、予め添加しておく必要があった。

このアミノ酸、含硫還元剤、酸化防止剤もしくはその混合物は、顆粒球コロニー刺激因子1重量部に対し1重量部~10,000重量部の範囲内の量で使用することが好ましい。

更に本発明の安定なG-C-S-F含有製剤は、その製剤化の目的のために、希釈剤、溶解補助剤、等張化剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤および吸着防止剤等を含有することができる。

本発明の安定化されたG-C-S-F含有製剤は、経口、各種の注射等の非経口投与形式として使用でき、該投与形式に応じた様々な剤形で実現できる。例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、懸濁剤等の経口投与剤、あるいは静注、筋注、皮下注、皮内注等の溶液、懸濁注射剤、凍結乾燥製剤、あるいは坐剤、経鼻剤、腫剤等の経粘膜投与剤形をその典型的なものとして例示できる。

作用

上記の如く、感染症等の化学療法においては、抗生物質、抗菌剤等の薬剤の他、患者の抵抗力、

そこで、本発明ではG-C-S-F含有製剤にアミノ酸、含硫還元剤および酸化防止剤からなる群から選ばれた少なくとも1種を添加することにより上記問題点を解決した。これらの添加剤は、例えば温度、湿度で促進される自動酸化の速度を抑制し、もしくはこれらにもとずく会合あるいは重合を防止し得るものとする。

これらの結果から推測される現象は、G-C-S-Fが高分子蛋白質ゆえに詳細な反応機構は明らかではないがG-C-S-Fの安定化のために効果的に働いている。このような問題は注射用溶液、懸濁剤などにおいて顕著なものであるが、その他の錠剤等の製剤過程においても同様にみられる問題であり、アミノ酸あるいは含硫還元剤あるいは酸化防止剤の使用は、このような場合にも有効である。

これらのアミノ酸、含硫還元剤および酸化防止剤から選ばれる少なくとも1種を添加することによってG-C-S-Fは大巾に安定化され、以下の実施例で実証するように長期に亘りG-C-S-Fの活性を有効に維持することができる。これらは、上

記の添加剤の使用により、G-C S F分子が外的因子から保護され、これらの間の例えば会合、重合の確率が大幅に減じられたためと推測する。

このような理由から、アミノ酸、含硫還元剤および酸化防止剤からなる群から選ばれる少なくとも1種もしくはその混合物としての添加剤の使用量は、特にその下限は臨界的であり、上記の如くG-C S F含有製剤中のG-C S F 1重量部に対し1重量部～10,000重量部の範囲内であることが好ましい。

上記の如く、本発明によれば効果的にG-C S Fの安定性を維持し得ることから、極微量成分としてのG-C S Fの極めて特異性の高い有効性と活性を治療上利用することが可能となり、更に高価な成分の浪費を防止し得ることから、製品コストの低下という面でも目的を達成することが可能となる。

実施例

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説

明する。しかしながら、本発明は以下の例によって何等制限されるものではない。

尚、以下の実施例においてG-C S Fの残存活性の測定は以下の如く実施した。

(a) マウス骨髓細胞を用いる軟寒天法

ウマ血清 0.4ml、被検体 0.1ml、C3H/HeN (メス) マウスの骨髓細胞浮遊液 0.1ml ($0.5 \sim 1 \times 10^5$ 有核細胞)、寒天を0.75%含む改変マッコイ5A培養液 0.4mlを混合し、直径35mmの組織培養用プラスチックディッシュに入れて固ませた後、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件にて5日間培養し、形成されたコロニー数(50個以上の細胞からなる集落を1コロニーとする)を数え、1個のコロニーを形成する活性を1単位(Unit)とした。

尚、上記(a)の方法において用いた「改変マッコイ5A培養液」は次の如くして作製した。

改変マッコイ5A培養液 (2倍濃度)

マッコイ5A培養液〔ギブコ(GIBCO)社製〕12g、MEMアミノ酸ビタミン培地(日水製薬社製)2.55g、重炭酸ナトリウム2.18g、ペニシリンGカリウム50,000単位を2回蒸留水500mlに溶解後、0.22μmのミリポアフィルターにて濾過滅菌を行った後使用した。

実施例1

G-C S F 50μgに第1表に示す添加剤を添加したG-C S F 50μg/ml含有製剤(20mMリン酸緩衝液、100mM塩化ナトリウム含有、pH7.4)を無菌的に調製し、次いで凍結乾燥製剤を製造した。G-C S F活性の経時変化は上記(a)マウス骨髓細胞を用いる軟寒天法で測定した。結果は第1表に示す。尚、表中活性(%)とは、初期単位に対する相対割合であり、以下の式で定義される。

$$\text{活性(\%)} = \frac{\text{所定時間経過後の活性単位}}{\text{初期活性単位}} \times 100$$

凍結乾燥条件は以下の通りである：

安定化剤を添加したG-C S F溶液を無菌サルフ

ァ処理ガラスバイアルに入れ、-40℃以下で4時間凍結し、-40℃から0℃、真空度0.03から0.1 Torrで、48時間一次乾燥した。次いで0℃から20℃、真空度0.03から0.08 Torrで12時間二次乾燥し、バイアル内部を無菌乾燥窒素ガスで大気圧になるまで置換する。次いで凍結乾燥用ゴム栓で打栓し、アルミニウムキャップで密封する。

第1表

添 加 剤	添加量 (重量部)	活性 (%) 4℃ 6ヶ月 保存後	活性 (%) 37℃ 1ヶ月 保存後
トリプトファン	1000	89	88
ヒスチジン	1000	98	94
システイン	1000	95	85
チオグリコール酸 ナトリウム	200	92	86
チオ硫酸ナトリウム	200	89	87
d,l- α - トコフェロール	100	97	92
ジチルヒドロキシ トルエン	20	91	90
レ-アスコルビン酸 ナトリウム	100	97	92
無添加	—	74	58

実施例 2

G-C S F 50 μ g に第2表に示す添加剤を添加したG-C S F 10 μ g / ml 含有製剤 (20 mM リン酸緩衝液、100 mM 塩化ナトリウム含有、pH7.4)

第2表

添 加 剤	添加量 (重量部)	活 性 %		
		4℃ 7日間 保存後	4℃ 2ヶ月間 保存後	室温1ヶ月 保存後
トリプトファン	100	98	94	93
ヒスチジン	100	96	90	90
システイン	100	98	97	94
チオグリコール酸 ナトリウム	100	97	92	87
チオ硫酸ナトリウム	200	99	90	87
d,l- α - トコフェロール	100	98	90	84
レ-アスコルビン酸 ナトリウム	100	97	88	80
ジチルヒドロキシ トルエン	50	93	93	91
トリプトファン チオ硫酸ナトリウム	100 100	98	95	92
無添加	—	89	71	57

を無菌的に調製し、サルファ処理ガラスバイアル内に無菌的に充填、密封してG-C S F 溶液製剤を製造した。これらの溶液製剤について、G-C S F 活性の経過時変化を実施例1と同様の方法で測定し、その結果を第2表に示した。

発明の効果

以上詳しく述べたように、本発明によれば、アミノ酸、含硫還元剤、酸化防止剤の少なくとも1種を所定量で用いたことにより、製剤中に極微量で存在するG-C S F の温度、湿度、酸素、紫外線等の外的因子にもとずく会合、重合あるいは酸化の結果として生ずる有効成分の損失、活性の低下等に関する諸問題点を効果的に解決することが可能となった。

従って、患者に対するG-C S F の投与量を極めて正確に投与、管理することが可能となり、しかも高価なG-C S F を有効利用できるのでG-C S F 含有製剤のコスト低減を図ることも可能となる。

特許出願人 中外製薬株式会社
代 理 人 弁理士 越 場 隆